



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **60244861 A**(43) Date of publication of application: **04.12.85**

(51) Int. Cl.

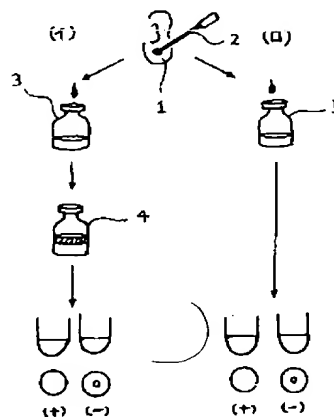
**G01N 33/53**(21) Application number: **59099704**(22) Date of filing: **19.05.84**(71) Applicant: **HASHIMOTO MASAKATSU**(72) Inventor: **HASHIMOTO MASAKATSU**(54) **HEMOLYSIS TYPE MEASURING METHOD AND REAGENT KIT USED THEREIN**

## (57) Abstract:

**PURPOSE:** To make easily an immunological measurement by diluting blood with a hemolyzing agent contg. hemolysis poison to hemolyze blood cell components then adding the dilute hemolysis sample into an immunological measuring reaction system and measuring an antigen or antibody.

**CONSTITUTION:** The unclotted blood is diluted with the hemolyzing agent contg. water or hemolysis poison such as saponin. The volumetric ratio between the blood and the hemolyzing agent is preferably blood:hemolyzing agent <sup>3</sup>(1:10). The hemolysis is nearly perfect in about 10 seconds but the mixture is preferably shaken. The measuring reaction system for the antigen or antibody in blood can be utilized for the immunological measuring reaction system. The earlobe 1 is scored by a knife to bleed the same in the figure, and after 10 $\mu$ l blood is sampled by a microsampling tube 2, the sample is put into a vial 3 contg. 100 $\mu$ l distilled water and is diluted. The blood is hemolyzed by shaking and thereafter the entire volume is transferred into a vial 4 contg. 300 $\mu$ l diluent and the antigen or antibody is measured by an R-PHA method.

COPYRIGHT: (C)1985,JPO&amp;Japio



## ⑫ 公開特許公報(A)

昭60-244861

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>  
G 01 N 33/53

識別記号

庁内整理番号  
7906-2G

⑭ 公開 昭和60年(1985)12月4日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑮ 発明の名称 溶血式測定方法及びそれに使用する試薬キット

⑯ 特 願 昭59-99704

⑰ 出 願 昭59(1984)5月19日

⑱ 発 明 者 橋 本 正 勝 東京都板橋区幸町五番十五・八〇号

⑲ 出 願 人 橋 本 正 勝 東京都板橋区幸町5番15-801号

## 明 細 書

1. 発明の名称 溶血式測定方法及びそれに使用する試薬キット

## 2. 特許請求の範囲

- 1) 血液を溶血剤で希釈して血球成分を溶血させ、しかる後希釈溶血試料を免疫学的固定反応系に添加し、抗原又は抗体を測定することとを特徴とする溶血式測定方法。
- 2) 溶血剤が水である特許請求の範囲第1項記載の溶血式測定方法。
- 3) 溶血剤が溶血毒を含有する溶血剤である特許請求の範囲第1項記載の溶血式測定方法。
- 4) 溶血毒がサポニンである特許請求の範囲第2項記載の溶血式測定方法。
- 5) 10  $\mu$ l 採取用マイクロサンプリングチューブ、溶血剤100  $\mu$ l 入りアンプル、希釈剤800  $\mu$ l 入りアンプル、感作血球試薬、対照用血球及び反応用器具からなることを特徴とする溶血式測定試薬キット。
- 6) 溶血剤が水である特許請求の範囲第2項記

載の溶血式測定試薬キット。

7) 溶血剤が溶血毒を含有する溶血剤である特許請求の範囲第3項記載の溶血式測定試薬キット。

8) 溶血毒がサポニンである特許請求の範囲第4項記載の溶血式測定試薬キット。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は血液中の血球成分を分離することなく希釈、溶血させて血液中の抗原又は抗体を測定する溶血式測定方法及びそれに使用する試薬キットに関するものである。

(従来技術)

近年、輸血後にB型肝炎を発症する例が増加し、社会問題となつている。

そのため、輸血用血液中のHBウイルス関連抗原の検出法として、ラジオイムノアッセイ法をはじめとして種々の測定系が開発されているが、手軽に実施できる標準的な方法として逆受身赤血球凝集反応法(以下R-PHA法とする)が広く普

及している。

しかし、前記 R - P H A 法においても、血液を分取又は採取し、遠心分離用の沈降試験管に移して遠心機で遠心分離し、上清である血漿又は血清をピペットで静かに吸い取り、試験管に移し、更に該試験管からピペットにて一定量採取して希釈した後測定反応に供しなければならない。従つて、操作に手間がかかり、又多数の器具を必要とする等の問題点があつた。

〔発明が解決しようとする問題点〕

本発明は、血液から血漿又は血清等の凝固検体を分取するために必要とされる手間のかかる操作と多数の器具を不要とし、赤血球又はラテックスを担体とする免疫学的測定方法を簡便に行なえるようにしようとするものである。

血液から血球成分を分離することなく、全血をそのまま希釈して測定反応系に添加することも考えられるが、この方法では後記実施例 1 における比較例に示されるように被験検体由来の血球が沈降して判定結果に影響を及ぼすおそれがある。こ

採血直後の血液を使用することもできる。血液の凝固していないものが好ましい。輸血用血液には通常抗凝固剤例えばクエン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、ヘパリン等が添加されているが、これらの抗凝固剤が添加されていても殆ど影響ない。

溶血剤としては、水又は溶血毒を含有する溶血剤を使用することができる。

水は真水であればよいが、測定反応に及ぼす非特異的な影響を考慮するとイオン交換水、蒸留水が好ましい。但し、水で血液を高希釈倍まで希釈すると、イオン強度が低下し過ぎて感作血球が非特異的に凝集する傾向を生ずる等の影響があるので、測定反応系内の塩濃度を補うようにする。

又、溶血毒としてはサガニン等の化学薬品、蛇毒等の動物性溶血毒、リチン等の植物性溶血毒、スタフィロリジン等の細菌性溶血毒等が使用できる。これらの溶血毒の溶媒としては水、生理食塩液、血液とはほぼ等張のリン酸緩衝液等の緩衝液が使用できる。その濃度は溶血の程度により異なる

の影響を回避しようとする、高希釈倍する必要があるため検出感度が低下してしまう。

又、7〜8μ程度の微小粒子である血球成分を簡便に通過できる適当な材料を見出すこともできなかった。

本発明者は更に検討を重ね、血球成分を破壊することによりその影響を除外することが可能になることを見出し、本発明を完成した。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明は、血液を水又はサガニン等の溶血毒を含有する溶血剤等の溶血剤で希釈して血球成分を溶血させ、しかる後希釈溶血試料を免疫学的測定反応系に添加し、抗原又は抗体を測定することを特徴とする溶血式測定法、及び 10μL 採取用マイクロサンプリングチューブ、溶血剤 100μL 入りアンプル、希釈剤 800μL 入りアンプル、感作血球試薬、対照用血球及び反応用器具からなることを特徴とする溶血式測定試薬キットにかか

るものである。

ここで、血液としては輸血用血液はかりでなく、溶血毒を用いる場合は血液と等張の溶血中で溶血させることができるので便利である。

血液と溶血剤の量比は血液：溶血剤 = 1：10 以上が好ましい。希釈倍数が 10 倍よりも小さいと例えば 3 倍又は 5 倍では溶血が不完全となり、溶血しなかつた血球が沈降し、R - P H A 法の場合には弱陽性検体の判定に困難を伴うおそれがある。又、希釈倍数が 10 倍以上例えば 30 倍では、前述のように溶血剤として水を用いた場合には塩濃度及び蛋白濃度の低下により、感作血球の沈降性が低下し非特異的な凝集傾向を生ずるので、これらを補う必要がある。

溶血は約 10 秒ではほぼ完全であるが振盪することが好ましい。10 倍希釈溶血試料を必要に応じて緩衝液成分、蛋白成分等からなる希釈剤により倍數希釈することも可能である。

免疫学的測定反応系としては、血中の抗原又は抗体の測定反応系例えば H B ウィルス関連抗原、α - フェトプロテイン、O R P 等の抗原測定系、

抗梅毒トレポネーマ抗体、抗溶連菌抗体、抗HBウイルス関連抗原抗体、抗DNA抗体等の抗体測定系が利用できる。特に、測定すべき抗原又は抗体に対応する抗又は抗原を赤血球或はラテックスに感作した試薬を用いる測定反応系に造する。これらの測定反応系は独自に開発したものでもよいし、市販の測定試薬キットを利用することもできる。

前記溶血剤で血液を10倍以上に希釈すると測定すべき抗原又は抗体の安定性が懸念されるが、HBウイルス関連抗原の場合には蒸留水による溶血、及び溶血剤例えばサボニン等を含有する溶血剤による溶血のいずれにおいても安定である。蒸留水では不安定な物質を測定対象とする場合でも、溶血剤と緩衝液系を適宜選択することにより安定に測定することができる。

以上の各組成はアンプル、バイアル等に充填し、反応用器具として試験管、丸底アンプル、反応用トレイ等を添付することにより測定用試薬キットにすることができる。

するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例1

HB抗原陽性及び陰性の全血検体50 $\mu$ lを500 $\mu$ lの蒸留水の入った容器に加え、振盪して溶血後、希釈剤を加えて倍数希釈列(X10、X20、X40、X80、X160、X320、X640、X1280)を作成し、R-PHA法用の試料とする。

比較として前記全血検体各50 $\mu$ lを500 $\mu$ lの希釈剤の入った容器に加えて10倍希釈し、更に希釈剤で同様の倍数希釈列を作成し、非溶血希釈試料とする。

これらの試料を抗HB<sub>s</sub>抗体を感作した血球試薬中に添加し、よく攪拌した後8時間静置し、管底像により判定した。血球試薬の非特異的凝集の有無を知るため抗HB<sub>s</sub>抗体非感作の対照血球を用いて同様の反応操作を行ない比較した。

なお、希釈剤、血球試薬、対照血球は市販のHB<sub>s</sub>抗原測定用のR-PHA試薬(セロディア

#### (作用)

血液中の血成分は水又は溶血剤を含有する溶血剤中で溶血するため、そのまま或は必要に応じ適宜希釈して免疫学的測定反応系に添加しても、感作赤血球の凝集反応や沈降に干渉せず或は感作ラテックスの凝集像又は非凝集像に影響を及ぼすことなく、血液中の抗原又は抗体の測定ができる。

感作赤血球は固定により安定化されており、又感作ラテックスは安定であるので、イオン強度の多少の低下や微量の溶血剤の存在により、反応に支障を来すことはない。

又、希釈溶血試料を免疫学的測定反応系に添加するので、低希釈倍数試料においてはヘモグロビンの強い赤色を呈するが、これによつて判定に支障を来すこともない。

溶血式測定試薬キットを使用すれば、測定のための準備が最少限で済むため、手軽に測定することができる。

#### (実施例)

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明

HB<sub>s</sub>(富士レピオ社製)を使用した。判定は管底像を肉眼により観察し、凝集像を+、沈降像を-とした(以下同じ)。

結果を下記第1表に示す。

第1表

		希 釈 倍 数							
		X10	X20	X40	X80	X160	X320	X640	X1280
実 施 例	陽性 検体	感作血球	+	+	+	+	+	+	+
		対照血球	-	-	-	-	-	-	-
	陰性 検体	感作血球	-	-	-	-	-	-	-
		対照血球	-	-	-	-	-	-	-
比 較 例	陽性 検体	感作血球	-	-	-	±	+	+	+
		対照血球	-	-	-	-	-	-	-
	陰性 検体	感作血球	-	-	-	-	-	-	-
		対照血球	-	-	-	-	-	-	-

陽性検体を溶血測定法により測定すると、X10乃至X1280でいずれも凝集(+)したのに対し、非溶血試料を用いた比較例では被験全血検体に由来する血球成分が沈降するため160倍以上

に非溶血試料を希釈しないと陽性検体を陰性に見誤まるおそれがある。従つて、100倍以上に希釈しなければならない非溶血全血測定法は、血清検体の30倍希釈から測定する通常のR-PHA法に比べて検出感度が $\frac{1}{30}$ 以下となつてしまい不利である。これに対し、本発明の溶血式測定法では通常の血清測定の場合の感度と同程度の検出感度が期待できることとなる。

#### 実施例3

実施例1で使用したHB<sub>s</sub>抗原陽性及び陰性の全血検体50 $\mu$ lを500 $\mu$ lのサポニン含有溶血剤(サポニン濃度1%)を用いて希釈、溶血させ、実施例1と同様の操作で測定した。

その結果は前記第1表の実施例と同様の結果であつた。

#### 実施例4

全血検体を5例選り各全血検体にメタクエン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、ヘパリンを夫々通常使用する濃度となるよう添加し、実施例1と同様の方法で測定した。

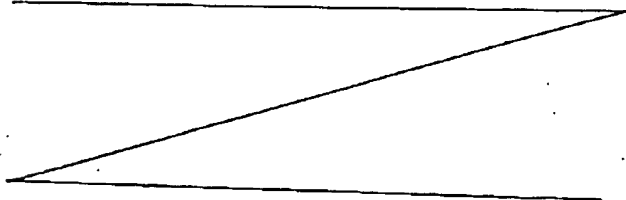
第2表

本発明の溶血式 測定方法 常法による R-PHA法	HB <sub>s</sub> 抗原測定用 試薬キット(市販品)	抗HB <sub>s</sub> モノクローナル抗体 感作血球試薬	
		陽性	陰性
HB <sub>s</sub> 抗原測定用 試薬キット(市販品)	陽性	5	0
	陰性	0	18

#### 実施例5

全血検体71例を前記実施例4と同様に希釈し、原血液換算で40倍及び80倍希釈して希釈溶血試料とする。この希釈溶血試料を市販のHB<sub>s</sub>測定試薬キットを用いて測定すると共に、全血検体から血清を分離して市販のHB<sub>s</sub>測定試薬キットにより測定し比較した。

結果を下記第3表及び第4表に示す。



これらの抗凝固剤の有無ならびに種類によつて、測定結果が影響されることはなかつた。

#### 実施例6

全血検体33例を蒸留水にて10倍希釈して、溶血させ、更に希釈剤にて4倍希釈して希釈溶血試料とする。この希釈溶血試料を抗HB<sub>s</sub>モノクローナル抗体感作血球試薬で測定すると共に、全血検体から血清を分離して市販のHB<sub>s</sub>測定試薬により常法のR-PHA法で測定し比較した。

なお、前記抗HB<sub>s</sub>モノクローナル抗体感作血球試薬は、市販の抗HB<sub>s</sub>モノクローナル抗体(ハイブリテック社:サブグループad、及び医学微生物研究所:サブグループa)を使用し、ワイド(Wide.L)のタンニン酸法によりニワトリ赤血球に感作することにより調整した。

結果は下記第2表に示す通りであり、抗HB<sub>s</sub>モノクローナル抗体感作血球試薬を用いた本発明の溶血式測定方法による測定結果と常法による測定結果とは100%一致した。

第3表

本発明の溶血式 測定方法 常法による R-PHA法	HB <sub>s</sub> 抗原測定用 試薬キット (市販品)	HB <sub>s</sub> 抗原測定用 試薬キット (市販品)×40	
		陽性	陰性
HB <sub>s</sub> 抗原測定用 試薬キット (市販品)	陽性	3	0
	陰性	14	55
		16	55
		71	71

第4表

本発明の溶血式 測定方法 常法による R-PHA法	HB <sub>s</sub> 抗原測定用 試薬キット (市販品)	HB <sub>s</sub> 抗原測定用 試薬キット (市販品)×80	
		陽性	陰性
HB <sub>s</sub> 抗原測定用 試薬キット (市販品)	陽性	1	1
	陰性	0	89
		1	90
		71	71

本発明の溶血式測定方法は、40倍 釈試料では陽性と判定されたもの16例、陰性と判定されたもの55例であり、80倍 釈試料では陽性と判定されたもの1例、陰性と判定されたもの70例であつた。なお、40倍希釈で陽性と判定された検体16例中4例(35%)にエンザイムイムノアッセイ法によるHB<sub>s</sub>抗原測定試験キット(アボット社製)で陽性の検体が見出された。従つて、市販のR-PHA法によるHB<sub>s</sub>抗原測定試験キットの抗HB<sub>s</sub>抗体感作血球は、前記実施例4で使用した抗HB<sub>s</sub>モノクローナル抗体感作血球に比べ、特異性及び感度において若干劣るが実用上充分である。

#### 実施例5

本発明の溶血式測定方法を実施するための試験キットの組成の一例を示せば次のとおりであり、10 $\mu$ l採取用マイクロサンプリングチューブ、蒸留水100 $\mu$ l入りアンプル、希釈剤800 $\mu$ l入りアンプル、抗体感作血球及び対照用血球である。

で測定することができる。

- (i) 抗凝血剤の影響を受けないので、輸血用血液、血液検査用検体中の抗原又は抗体の測定を容易に行なうことができる。特に近年問題となつてゐるHB関連抗原の測定に有用である。
- (ii) 全血をそのまま希釈溶血して反応系に添加するようにしたので、血液検体量が極く値でよい。
- (iii) 血液検体量が少量でよいので、従来のような静脈採血をしなくても、例えば耳だから採血することができ、子供、老人、貧血患者等からの採血も容易となり、又顔面の採血、測定も可能となる。従つて、静脈採血のための注射器、注射針、試験管等が不要になる。

耳だからの採血は図(i)に示すとおりであり、メスにより耳だ(1)を傷つけて出血させ、マイクロサンプリングチューブ(2)により10 $\mu$ lの血液を採取し、図(i)の場合は蒸留水100 $\mu$ l入りバイアル(3)に入れて希釈し、振盪して溶血した後全量を希釈剤800 $\mu$ l入りバイアル(4)に移し、R-PHA法により測定する。又、図(ii)

又、試験キットの組成の他の例としては、10 $\mu$ l採取用マイクロサンプリングチューブ、溶血剤含有緩衝剤400 $\mu$ l入りアンプル、抗体感作血球及び対照用血球である。

以上の 合において、抗体感作血 及び対照用血球はバイアル若しくはアンプルに充填し、バイアルの場合には反応用器具として反応用試験管若しくは反応用トレイを使用し、アンプルの場合には丸底アンプルを用いてそのまま反応に使用できるようにするとよい。

#### (効果)

以上述べたように本発明の溶血式測定方法及びそれに使用する試験キットによれば下記の如き種々の優れた効果を発揮する。

- (i) 全血をそのまま希釈溶血して免疫学的測定反応系に添加するようにしたので、従来必要としていた全血からの血球成分の分離除去操作が不要になる。従つて、遠心機やその他の多数の器具が不要になり、手間のかかる操作も省略できるので、大量の測定検体を簡便な操作で短時間

の場合は溶血剤含有緩衝剤400 $\mu$ l入りバイアル(5)に入れて希釈溶血し、R-PHA法により測定する。このように測定操作は何ら繁雑な操作を必要とせず、極めて簡単である。

- (iv) 血液検体量が少量でよいので、歯科領域において歯肉より採血した血液検体も測定対象とすることができる。

このことは、素手で患者の唾液や血液に接する機会が多い歯科医師においてもB型肝炎の蔓延が社会問題の一つとしてクローズアップされている現在では重要である。すなわち、歯科領域では患者が長期間通院治療する例が多いため、歯科医師は繰り返し感染の機会にさらされることとなり、HB<sub>s</sub>抗原の簡便迅速な測定系が必要であり、本発明の溶血式測定方法及びそれに使用する試験キットはこれらの要請にも応えられるものである。

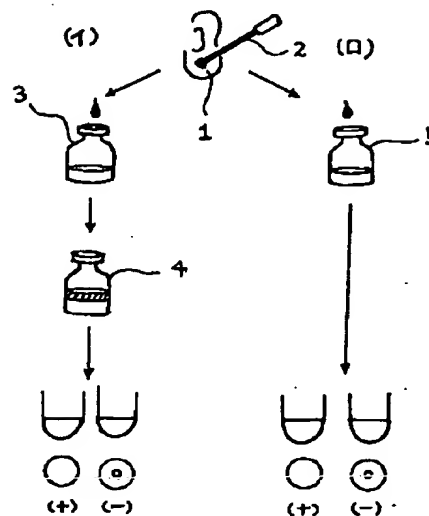
#### 4. 図面の簡単な説明

図(i)は本発明の溶血式測定方法の操作方法の一例を示す図、図(ii)は同他の例を示す図である。

(2)はマイクロサンプリングチューブ、(3)は凝固水100 $\mu$ l入りバイアル、(4)は希釈剤800 $\mu$ l入りバイアル、(5)は溶血剤含有緩衝剤400 $\mu$ l入りバイアルを示す。

図面の浄書(内容に変更なし)

# 第1図



特許出願人 橋本正勝

## 手続補正書(方式)

昭和59年9月26日

特許庁長官 志賀 孝 殿

### 1. 事件の表示

昭和59年 特許願第99704号

### 2. 発明の名称

溶血式測定方法及び  
それに使用する試薬キット

### 3. 補正をする者

特許出願人

東京都板橋区幸町五番十五-八〇号

橋本正勝

### 4. 補正命令の日付(発送日)

昭和59年8月8日(59.8.8)

### 5. 補正の対象

明細書の図面の簡単な説明の欄、図面

### 6. 補正の内容

### (1) 明細書の図面の簡単な説明の欄の補正

第18頁第19行乃至第20行における

「図(1)は……である。」

を

「第1図(1)は本発明の溶血式測定方法の説明図であり、第1図(1)は測定方法の一例を示す図、第1図(2)は測定方法の他の例を示す図である。」

と補正する。

### (2) 図面の補正

図面全図を削除し、新たに第1図を追加する。

### 7. 添付書類の目録

(1) 図面

1 通

特許庁